

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/14560 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/29, C07K 14/415,
C12N 5/10, A01H 5/00, C12P 21/02

Shigeru) [JP/JP]; 〒444-0874 愛知県岡崎市竜美南
2-4-1-3-21 Aichi (JP). 田中幸子 (TANAKA, Sachiko)
[JP/JP]; 〒444-0802 愛知県岡崎市美合町五本松61番
地 Aichi (JP). 稲垣善茂 (INAGAKI, Yoshishige) [JP/JP];
〒444-0851 愛知県岡崎市久後崎町宮下2 城南ハイ
ツ105 Aichi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05722

(22) 国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒
105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37
森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, NZ, US.

(30) 優先権データ:
特願平11/236800 1999年8月24日 (24.08.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サント
リー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-
8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka
(JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 飯田 滋 (IIDA,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドノート」を参照。

(54) Title: GENES ENCODING PROTEINS REGULATING pH OF VACUOLES

(54) 発明の名称: 液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

(57) Abstract: Genes encoding proteins having an activity of regulating the pH of vacuoles, for example, a gene originating in morning glory and encoding a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. When inserted into a plant and expressed therein, such a gene can control the flower color via the regulation of the vacuolar pH.

(57) 要約:

液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、例
えばアサガオに由来し、配列番号: 2に示すようなアミノ酸配列を
有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子を植物に
挿入して発現せしめることにより、液胞のpHの調節を介して花の色
を制御することができる。

WO 01/14560 A1



明 細 書

液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

発明の技術分野

本発明は液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子およびその利用方法に関するものである。

背景技術

花き産業においては、顕花植物の新規なあるいは多様性に富んだ新品種の開発が重要であり、なかでも、花の色は花きの最も重要な形質のひとつである。交配による従来の育種により、さまざまな色の品種が育種されてきたが、単一の植物種がすべての色の品種を有することはまれであり、さまざまな色の品種開発が望まれている。

花の色の主な成分は、アントシアニンと総称されるフラボノイドの一群の化合物である。植物には多様なアントシアニンが存在することは知られており、それらの多くの構造が既に決定されている。アントシアニンの色は、一部は、その構造に依存している。アントシアニンの生合成に関わる酵素や遺伝子に関しても研究が進んでおり、分子生物学的手法と植物への遺伝子導入により、アントシアニンの構造を変換し、花の色を変えた例もある (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish, p. 1071, Plant Cell Physiol. 39 (1998) Tanaka et al, p1119.)。また、アントシアニンの色は、水溶液のpHにも依存し、同じアントシアニンでも水溶液のpHが中性から弱いアルカリ性で青く見える (現代化学、(1998年5月) 本田と斎藤、p. 25)。

アントシアニンは細胞の液胞に存在するため、液胞のpHが花の色

に大きな影響を与えることも知られている (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish, Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212)。たとえば、アサガオ (*Ipomea tricolor*) においては、赤紫色のつぼみが開花したときに青くなるのは、花弁上皮細胞の液胞のpHが6.6 から7.7 に上昇するためであることが知られている (Nature, 373 (1995), Yoshida et al. p291)。

植物細胞の液胞はおもに液胞プロトン輸送ATPaseと液胞プロトン輸送ピロフォスファターゼによって制御されているとされる (The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press) が、これらのプロトンポンプが花の色にどのように関わっているかは明確ではない。また、ナトリウムイオン-プロトンアンチポーター (以下、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターと記載) が植物の液胞に存在すること、また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターは、液胞の外と中のプロトン濃度勾配に依存してナトリウムイオンを液胞内に輸送し、その際プロトンが液胞外に輸送され、プロトン濃度勾配が減少することが知られていた。

さらに、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターは、分子量約17万の蛋白質であることが示唆されていた。しかしながら、液胞のpHの制御には多くの未知の要因があり、どのようにして液胞、特に花弁液胞のpHが制御されているのかは、不明確である (以上The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press)。また、植物液胞のpHを人為的に上昇させ、産業上有用な形質が得られたこともなく、花の色との関連も不明である。

また、分子量約7万の $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーター遺伝子がアラビドプシスからクローニングされ、この遺伝子を導入した酵母は耐塩性を獲得したことは知られているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxiola et al. p1480 ~1485)、このアンチポーター

が植物細胞の液胞のpHを制御しているかどうか、あるいは花の色に関わっているかどうかは知られていない。

一方、ペチュニアには花弁の液胞のpH制御に関わっている遺伝子座が7種あることがわかつており、これらのうちの一つがホモの劣性になることにより花弁の液胞のpHが上昇するとされている (Plant J. 13 (1998) van Houwelingen et al. P39, Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212)。そのうちの一つPh6はすでにクローン化されていて、転写調節因子の一種であることがわかつたが (Plant Cell 5 (1993) Chuck et al. p371)、実際にどのような生化学的な機構で液胞のpHを制御しているかは不明である。

また、アサガオ (*Ipomea nil*) においては、変異体の解析から花と葉の色や形に関わる遺伝子座がいくつかあり、これらのうち 19 が易変異性であることが知られている (植物細胞工学シリーズ 5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社, Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870)。これらの内で、青色ではなく紫色の花を咲かせるようになった劣性の変異により規定される 1 遺伝子座を Purple 遺伝子座と呼び (T. Hagiwara (1931) The genetics of flower colours in Phrabitis nil. J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo 51, 241-262. ; Y. Imai (1931) Analysis of flower colour in Pharbitis nil. J. Genet., 24: 203-224.)、紫の花弁に青いセクターを生じる花を咲かせる易変異変異のアリールは、purple-mutable (pr-m) と名付けられた (J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo, 12 (1934) Imai, p479)。なお、Purple 遺伝子座に由来する遺伝子を Purple 遺伝子と記す。

この青い部分は劣性のpurpleからの体細胞復帰突然変異により生じたと考えられ、さらに生殖細胞復帰突然変異体も分離できる。これら復帰突然変異体の復帰突然変異により生じたアリールをここで

はPurple-revertant(Pr-r)と名付ける。このような古典遺伝学的解析は、このPurple遺伝子に関しては行われていたが、このPurple遺伝子の実体や花弁液胞のpHの調節との関連等は全く不明であった。

液胞のpHを改変できれば、たとえば液胞のpHを上昇させることにより、花の色を青くすることができるであろうと考えられる。青い色のない植物種の代表例として、バラ、キク、カーネーション、ガーベラなどがあり、これらはきわめて重要な切り花である。液胞pHの改変の重要性は認識されてきたが、今までに花弁の液胞のpHを制御する蛋白質の実態は不明であり、これをコードする遺伝子の単離が望まれていた。

発明の開示

本発明は、植物細胞の液胞のpHを制御する蛋白質の遺伝子、好ましくは液胞でプロトンを輸送する蛋白質の遺伝子、より好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーター遺伝子を提供しようとするものである。本発明の遺伝子を植物に導入し、発現させることで、花色を調節し、好ましくは青色化することが可能である。

従って、本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子は、好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターをコードする遺伝子であり、例えば、配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子、あるいは配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して20%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；あるいは配列番号：2

記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である。

本発明はまた、前記の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、前記のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子によってコードされる蛋白質を提供する。

本発明はさらに、前記の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞から液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子、または前記のベクターが導入された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織を提供する。

本発明はまた、前記の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞の pH を制御する方法を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、プラスミド p SPB 607 の構造を示す図である。

図 2 は、プラスミド p SPB 608 の構造を示す図である。

図3は、プラスミドpINA 145の構造を示す図である。

図4は、プラスミドpINA 147の構造を示す図である。

発明の実施の形態

アサガオの遺伝子座Purpleは優性であると花弁の色は青で、ホモの劣性となると青い花弁が紫となる。この遺伝子座が花の色に関わっていることは明らかではあるが、その機構については不明である。

まず、pr-m変異体とその復帰突然変異体の花弁色素を化学分析したところ、両者の色素組成に差違は認められなかった。青色花アサガオの蕾は赤紫色で開花に伴って青色に変化するのは、前述のように、花弁細胞液胞のpH変化によると考えられる。

pr-m変異体では、開花に伴って青色に変化せず、さらに開花した花弁細胞の液胞のpHは、pr-m変異体のほうがPr-rに比べて低かった。それゆえ、Purple遺伝子は開花時の花弁細胞液胞内のpHを制御し、花色を調節する遺伝子と考えられる。そこで、pr-m変異体とその復帰突然変異体を用いて、トランスポゾン・ディスプレー法により、まずpr-mに特異的に存在するPurple遺伝子配列を含むゲノムDNAの断片を同定し、ついでPurple遺伝子を同定した。今回得られたPurple遺伝子は驚くべきことにアラビドプシスなどの $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターと相同性を持ち、pr-m変異はPurple遺伝子の5'非翻訳領域中にトランスポゾンが挿入されていた。

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号：2に記載するアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質も、もとの蛋白質と同様の活性を維持することが知られている。従って本発明は、液胞のpH

を制御する活性を有している蛋白質である限り、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質および当該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。

本発明はまた、配列番号：1に記載の塩基配列または配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはそれらの塩基配列の一部分をコードする塩基配列に対して、ストリングエントな条件下、例えば5xSSC、50°Cの条件下でハイブリダイズし、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。なお、適切なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えばアミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとした場合には50°C以下の温度が好ましい。

このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えば、ペチュニアやトレニア由来の遺伝子が挙げられるが、植物以外の由来であってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーター遺伝子はスーパーファミリーを形成しており (FEBS Lett. 424(1998) Debrov et al., p1)、アミノ酸配列で20%以上の相同性を有する (J. Biol. Chem. 272(1997) Orlowski et al., p22373)。

そこで本発明はさらに配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して約20%以上、好ましくは50%以上、例えば60%または70%以上、の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

生来の塩基配列を有する遺伝子は実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAは生来の塩基配列を有するDNAを基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば修飾を導入したいDNA断片を生来のcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得る。その後、この変異を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA断片を合成し、連結すればよい。

本発明はアサガオ由来の液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のみに限定されるものではなく、起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、液胞においてプロトンを汲み出すトポロジーを持っていればよい。

また、得られた遺伝子を大腸菌または酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、活性を測定することにより、得られた遺伝子が液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードすることを確認することができる。さらに、当該遺伝子を発現させることにより、遺伝子産物である液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質を得ることができる。あるいはまた、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対する抗体を用いても、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質を

得ることができ、抗体を用いて他の生物の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をクローン化することもできる。

従って本発明はまた、前述の遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) 、バシルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバシルス・スブシルス (*Bacillus subtilis*) など常用の宿主を用いることができる。真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。

酵母としては例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 、ペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えば *trc* プロモーター、*tac* プロモーター、*lac* プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05 プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては

例えばアミラーゼプロモーター、*trpC*プロモーター等が使用される

。

また動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常用に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も常法に従って行うことができる。

前記の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養、栽培または飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とするタンパク質を回収、精製することができる。

さらに本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、具体的には、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーター遺伝子を導入することにより、色合いが調節された植物もしくはその子孫又はこれらの組織に関するものであり、その形態は切り花であってもよい。本発明で得た液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を用いると、液胞においてプロトンの細胞質への汲み出しとナトリウムイオンの汲み入れを行うことができ、液胞内に蓄積しているアントシアニンを青くでき、結果として花の色を青くすることができる。

また、本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを下げることも可能である。現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法やコサプレッション法によって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。

形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション

、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カラシコエ、ユリ、ペラルゴニアム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、ダイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

実施例

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

実施例 1. 生殖細胞復帰突然変異体の取得

生殖細胞復帰突然変異体の取得に関しては、すでに報告がある（植物細胞工学シリーズ 5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社、Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499）。

遺伝子型 (Pr-r/pr-m) を有するアサガオ (Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499) を自家受粉し、後代の種子を蒔き、それら自殖後代の花を観察して、復帰突然変異により青花を咲かせる個体を選抜し、さらにこの生殖細胞復帰突然変異体の自殖後代で、紫花を咲かせる分離体が得られるか否かでホモかヘテロかを検証し、遺伝子型 (Pr-r/ Pr-r) および (pr-m/pr-m) を有するものを選択した。

実施例 2. 復帰変異体花弁のアントシアニン

アサガオに含まれるアントシアニンはおもにヘブンリブルーアン

トシアニンであり、その他にいくつかのアントシアニンが含まれる (Phytochemistry 31 (1992) Lu et al. P659)。実施例1で得られたPr-r/ Pr-r株とpr-m/pr-m 株の開いた花弁を同様に解析したところ、両者に含まれるアントシアニンはほぼ同一であった。

セロハンテープを表側の花弁に貼り、剥がすことにより一層の上皮細胞だけを回収し、ここから細胞液をメスなどで搔き取り遠心して搾汁を得た。搾汁をホリバB212pH メーター（株式会社堀場製作所）にてpHを測定した。Pr-r/ Pr-r株の花弁上皮細胞のpHは約7.1であったのに対し、pr-m/pr-m 株の花弁上皮細胞のpHは約6.5 であった。この結果は、purpleの変異による花色の変化は、アントシアニンの構造によるものではなく液胞のpHの変化によるものであることを示す。

実施例3. pr-m に特異的に存在するゲノム断片の単離

遺伝子の単離にはトランスポゾンディスプレー法（たとえばPlant J. 13 (1998) Frey et al. p 717, Plant J. 13 (1998) Van den Broeck et al. p121）あるいは類似の方法（植物細胞工学シリーズ7 (1997)、土生ら、p144, 秀潤社）を用い、pr-m/pr-m 株とPr-w/pr-m 株には存在し、Pr-r/ Pr-r株と野性株には存在しないDNAのバンドを探した。アサガオにおいてはTpn1関連のトランスポゾンが主に易変異性に関与していると考えられるので、ここでもTpn1関連のトランスポゾンに着目した。

具体的には、pr-m/pr-m 株から染色体DNAを抽出し、125ngを20μl 中でMseIで消化した。消化したDNAに80 pmole のMseIアダプター (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' (配列番号: 3) と 5'-TACTCAGGACTCA T-3' (配列番号: 4) をアニールしたもの) を25μl 中で20°Cで2時間付加した。75°Cで10分間保持した後、-20°Cで保管した。これを10倍希釈した後、2 μl を鋳型とし、これを4.8 pmole のTIR プ

ライマー (5' -TGTGCATTTTCTTGTAGTG-3' (配列番号 : 5) 、トランスポゾン *Tpn1* の末端逆位繰り返し配列を含む) と 4.8 pmole の *MseI* プライマー (5' -GATGAGTCCTGAGTAA-3') (配列番号 : 6) を用いて 20 μ l 中で PCR により増幅した。

PCR は、Taq ポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 94°C 0.5 分、56°C 1 分、72°C 1 分を 1 サイクルとし、20 サイクル反応し、10 倍に希釈した。このうち 2 μ l を鋳型として、4.8 pmole の TIR + N プライマー (5' -TGTGCATTTTCTTGTAGN-3' (配列番号 : 7) N=A, C, G または T. 混合ではなく 4 種合成する。) と 4.8 pmole の *MseI* + N プライマー (5' -GATGAGTCCTGAGTAAN-3', (配列番号 : 8) N=A, C, G または T. 混合ではなく 4 種合成する。5' 端をフルオロセインで標識 (アマシャムファルマシアバイオテク株式会社 *Vistra fluorescence* 5' -オリゴラベリングキットを使用)) を用いて 20 μ l 中で PCR を行った。

反応はそれぞれのプライマーの組み合わせで行うため 16 反応をおこなう。PCR は、94°C 0.5 分、65°C 1 分 (1 サイクルごとに 0.7 °C づつ下げる) 、72°C 1 分を 1 サイクルとし、13 サイクル反応し、さらに 94°C 0.5 分、56°C 1 分、72°C 1 分を 1 サイクルとし、13 サイクル反応した。同様の操作を *Pr-r/ Pr-r* 株から得た染色体 DNA についても行い、DNA シークエンサー 377 (ピーアイバイオシステムズジャパン株式会社) のシークエンスゲルにて電気泳動を行い、FM BIOII (宝酒造株式会社) を用いてバンドを検出した。

Pr-r/ Pr-r 株と *pr-m/pr-m* 株由来のバンドを比較したところ、約 130 bp の DNA 断片が *pr-m* を有する株に特異的に発現していた。この 130 bp の DNA 断片を回収し、20 pmole TIR プライマーと 20 pmole *MseI* プライマーを用いて PCR (94°C 0.5 分、56°C 1 分、72°C 1 分を 1 サイクルとし、30 サイクル反応) により増幅し、pGEM-T ベクター

(Promega Corporation) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。その配列は、

5' -TGAGCATTTCCTTGTAGTG CTGAGATTTCTCCATTGTCTGAAGCTCTCATCCTAACAC
TACCCCCACATCTCACCTTCAAG GTCCAATCTTATCATTATCT TTACTCAGGACTCATCGTC-3'
(配列番号：9)

であった（1本下線部は使用したプライマー、2本下線はエクソン、その他はイントロンに対応）。配列番号：9に記載の配列をプローブとしてノザン解析を行ったところ、Pr-rを有するアサガオの蕾には約2.3kbの転写産物が存在したが、pr-m/pr-m株には対応する転写産物は存在しなかった。従って、この2.3kbの転写産物がPurple遺伝子に対応することがわかった。

実施例4. cDNAの単離

野生株アサガオ(Pr-w/Pr-w)由来のcDNAライブラリー(Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p375)の約600万個クローンを130bpDNA断片をプローブとしてスクリーニングし、2クローンの陽性クローンを得た。そのうち1クローンは、2237 bpのcDNAを持ち、その中には1626bpからなるオープンリーディングフレームが見られた（配列番号：1）。予測されるアミノ酸配列は、酵母とアラビドプシスのNa⁺-H⁺アンチポーター（それぞれNhxl, AtNhxl, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxiola et al. p1480 ~1485）に対して29.3%、73.4%の同一性を示した。

この結果からアサガオのPurple遺伝子はNa⁺-H⁺アンチポーターをコードしていることが判明した。なお、アラビドプシスから得られたNa⁺-H⁺アンチポーターは、酵母において耐塩性を与えるタンパク質として注目されているが、Na⁺-H⁺アンチポーターと花の色との関連が見出されたのは今回が初めてである。

実施例 5. 酵母Na⁺ -H⁺ アンチポーター変異体の相補実験

アサガオのPurple遺伝子がコードする推定アミノ酸配列は、酵母やアラビドプシスのNa⁺ -H⁺ アンチポーターのそれに相同意がある。そこで実際に、アサガオPurple遺伝子産物が、Na⁺ -H⁺ アンチポーター蛋白として機能できるか酵母Na⁺ -H⁺ アンチポーター変異体を用いた相補実験で確認した。

まず最初に、以下の2種類のDNA断片を合成した。

CBSC1-Linker (22mer) 5' - CGA TAG ATC TGG GGG TCG ACA T -3'

(配列番号: 12)

CSBC2-Linker (22mer) 5' - CGA TGT CGA CCC CCA GAT CTA T -3'

(配列番号: 13)

この2つのDNA断片からは、Clal-BgIII-Sall-Clalという制限酵素部位をもつリンカーができる。pYES2ベクター(Invitrogen Corporation)のClal部位にBgIIIサイトがURA3遺伝子側に位置するよう定法にしたがって上記のリンカーを挿入し、プラスミドpINA145を作成した(図3)。プラスミドpJJ250(Jones and Prakash, 1990, Yeast, 6, 363-366)をBamHIとSallで消化して得られる2kbのDNA断片をBgIIIとSallで消化したプラスミドpINA145とライゲーションし、プラスミドpINA147を作成した(図4)。プラスミドpINA147のGAL1プロモーターの制御下にPurple cDNAを連結してプラスミドpINA151を作成した。pINA147およびpINA151をNa⁺-H⁺アンチポーターの変異株である酵母R101株にそれぞれ形質転換した。酵母R101株はNa⁺-H⁺アンチポーター遺伝子の変異により400mM NaCl添加APG培地(Nass et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 26145; Gaxiola et al., 1999, 96, 1480-1485)では生育できない。pINA147を形質転換したR101株も同様に生育できなかつたが、pINA151を形質転換したR101株のみ400mM NaCl添加APG培地でも生育が

可能であった。この結果から、アサガオPurple遺伝子産物はNa⁺ -H⁺ アンチポーター機能を有していることが明らかになった。

実施例 6. 植物での発現ベクターの構築

アサガオPurple cDNA10ng を鋳型として、合成プライマーPR-5 (5'-GGGATCCAACAAAAATGGCTGTGGG-3') (配列番号：10) とPR-3 (5'-GGGTCGACTAAGCATAAAACATAGAGCC -3') (配列番号：11) を用いてPCRを行った。ポリメラーゼは、Taq ポリメラーゼ（東洋紡績株式会社）を使用し、95℃ 45秒反応後、95℃ 45秒、50℃ 45秒、72℃ 45秒を1サイクルとし、25サイクル反応し、さらに72度で10分反応した。得られた約1.6 kbのDNA断片をpCR2.1-Topo（クロンテック株式会社）にライゲーションし、pCR-purpleとした。このプラスミド上のPurple cDNAの塩基配列にPCRによるエラーがないことを確認した。

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37 (1996) Mitsuhara et al. p49) を SacI で消化し、平滑末端化した後、Xholリンカー（東洋紡績株式会社）を挿入し、得られたプラスミドをpBE2113-GUSxとした。これをEcoRI と HindIII で消化して得られる約2.7 kbのDNA断片をpBinPLUSのHidIIIとEcoRI 消化物と連結し、得られたプラスミドをpBEXP とした。

一方、pCGP484 (特表平8-511683号公報) を HindIII と XbaI で消化して得られる約1.2kb のDNA断片と、pCR-purpleをXbaI と SalI で消化して得られる約1.6kb のDNA断片と、pBEXP を HindII I と Xhol で消化して得られる約13kbのDNA断片をライゲーションし、pSPB607 を得た (図1)。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNA は、キンギョソウ由来カルコンシンターゼプロモーターと、アグロバクテリウム由来のノバリンシンターゼター

ミネーターの制御下にある。

また、pCGP669（特表平8-511683号公報）をHindIIIとBamHIで消化して得られる約0.8kbのDNA断片と、pCR-purpleをBamHIとSalIで消化して得られる約1.6kbのDNA断片と、pBEXPをHindIIIとXbaIで消化して得られる約13kbのDNA断片をライゲーションし、pSPB608を得た（図2）。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNAは、ペチュニア由来カルコンシンターゼAプロモーターと、アグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼターミネーターの制御下にある。

このようにして得られた発現ベクターを用いて植物の形質転換を行うことにより、液胞のpHを制御し、花色を調節することができる。

実施例7. Purple遺伝子のホモログの単離

ペチュニア（*Petunia hybrida* 品種 Old Glory Blue）、ニーレンベルギア（*Nierembergia hybrida* 品種NB 17）、トレニア（*Torenia hybrida* 品種サマーウエーブ・ブルー）の花弁由来cDNA libraryをcDNA synthesis kit (Stratagene USA) を用いてそれぞれ作成した。作成方法は、製造者の推奨する方法に従った。それぞれ約20万個のクローンを定法に従って、スクリーニングした。なお、メンブレンの洗浄には、5 x SSC, 0.1% SDS 水溶液を用い、50°Cで10分間、3回行った。得られた陽性クローンのうち、それぞれの最長クローンの塩基配列を決定した。ペチュニアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：14及び15に、ニーレンベルギアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：16及び17に、そしてトレニアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：18及び19に示す。ペチュニア、ニ

一レンベルギア及びトレニアのPurple遺伝子のホモログは、アサガオのPurple遺伝子に対してアミノ酸レベルでそれぞれ75%、76%及び71%の同一性を示した。

アサガオPurple遺伝子がコードする $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターとアラビドプシスのAtNhx 1 がコードする $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターのアミノ酸配列の同一性が約73%であることから、ここで得たペチュニア、ニーレンベルギア、トレニアのPurple遺伝子のホモログは、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターをコードしていると判断される。

実施例 8. アサガオPurple 染色体クローンの単離

変異型アサガオ(pr-m/pr-m) と復帰型アサガオ(Pr-r/Pr-r) の染色体DNAをBglIIIで切断後、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、アサガオPurpleのcDNAをプローブにそれぞれゲノミックサザン解析を行った。その結果、変異型アサガオでは無く、復帰型アサガオには存在する約 7.5kbのバンドを検出した。

野性型アサガオ(Pr-w/Pr-w、KKZSK2系統)の染色体DNA 50 μg をBglIIIで切断後、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、約 7~9kb の部分を切り出して GENECLEAN III KIT (BI0101) を用いて DNAを抽出した。このDNAを λ Zap express vector (Stratagene USA) にライゲーションし、アサガオ Purple のcDNAをプローブとしてスクリーニングした。得られたポジティブクローンの塩基配列を決定したところ、この約 7.5kbのDNA断片にPurpleのプロモーター上流約6.3kb とエキソン3の途中までの領域が存在した。この配列のうちPurple遺伝子の開始コドンまでの配列を配列番号：20に示す。

Purple遺伝子は、アサガオの開花約24時間前にのみ強く発現が誘導されること、また、5' - 非翻訳領域へのトランスポゾンの挿入により、Purple遺伝子の発現が抑制されることが判明している。このことから、得られたPurple遺伝子のプロモーター領域には、アサ

ガオ花弁で時期特異的、器官特異的にPurple遺伝子を発現させるために必要な因子を含んでいる。このプロモーター領域の下流に目的遺伝子を配置すれば、時期特異的、器官特異的に目的遺伝子の発現が制御できる。

産業上の利用可能性

本発明により得られた遺伝子が液胞のpHおよび花の色の調節に関わっていることがはじめて明らかとなった。また、本発明の遺伝子を花弁で発現することにより、液胞のpHを上昇させ、花の色を青く変化させることができる。また、本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを低下させ、花の色を赤く変化させることができる。液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子としては、本発明において得られたアサガオ由來のものだけでなく、他の生物の同様な遺伝子も用いることができる。

請 求 の 範 囲

1. 植物細胞の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
2. 配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する植物細胞の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
3. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して 1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
4. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して 20% 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。
5. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して 70% 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。
6. 配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。
7. 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。
8. 請求項 7 記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
9. 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。
10. 請求項 8 記載の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞から液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を採取す

ることを特徴とする該蛋白質の製造方法。

11. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子、または請求項7記載のベクターが導入され形質転換された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織。

12. 請求項11に記載の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花。

13. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子、または請求項7記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞のpHを制御する方法。

14. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子、または請求項7記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法。

Fig. 1

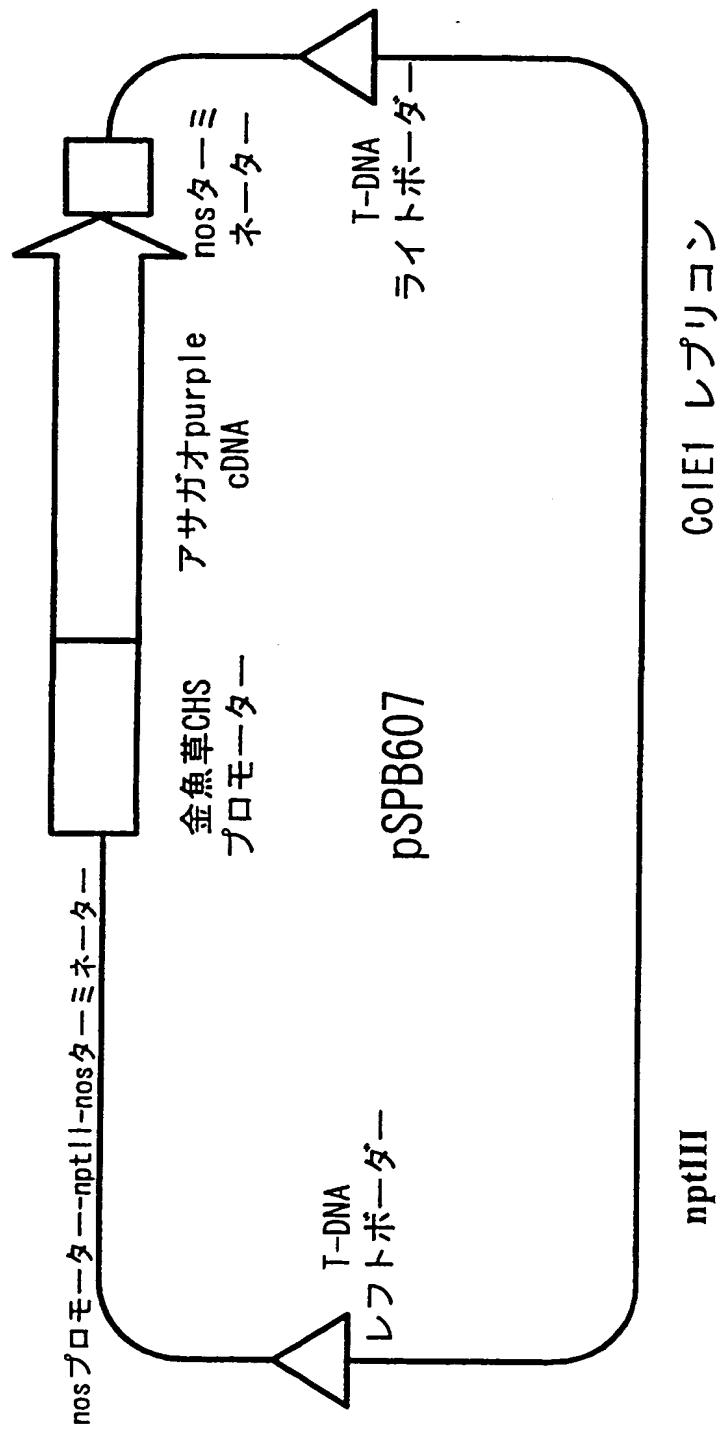


Fig. 2

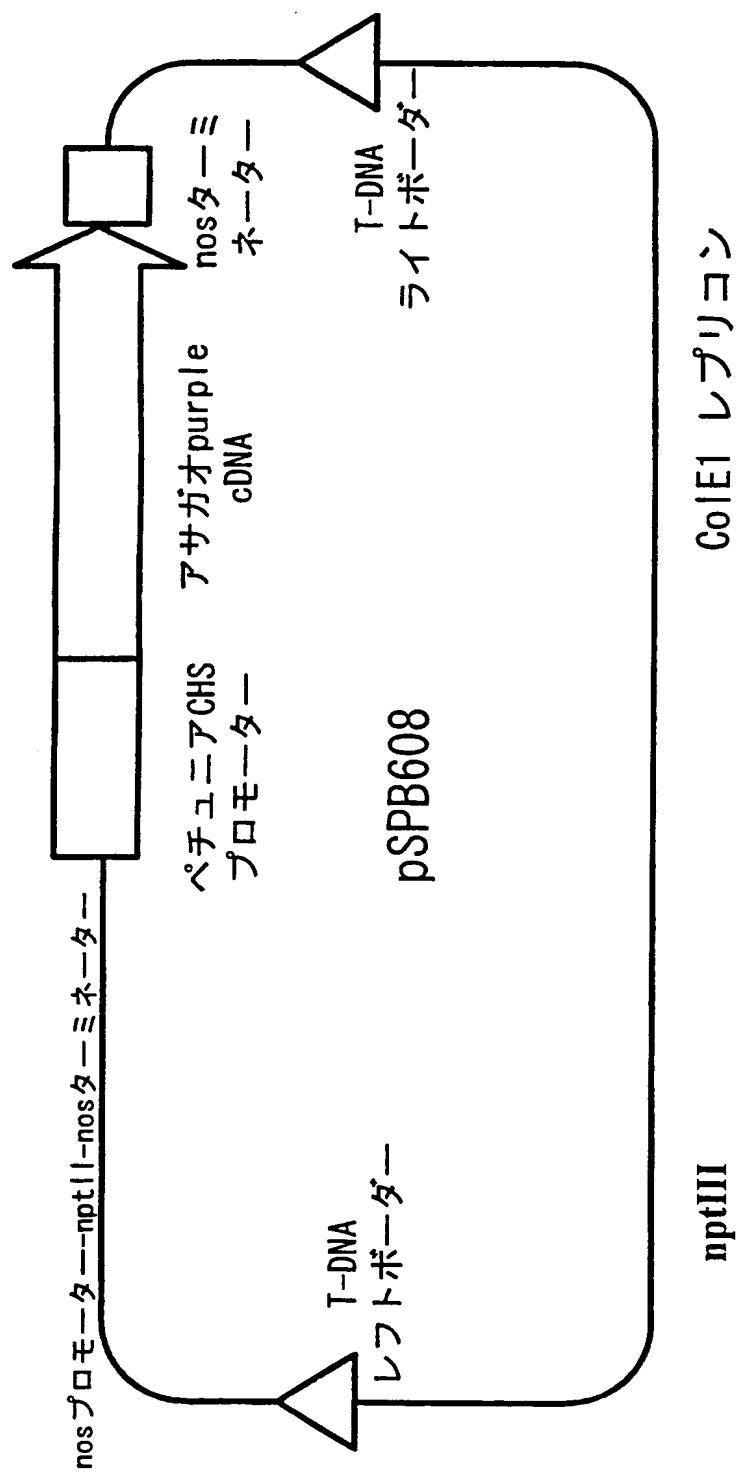


Fig.3

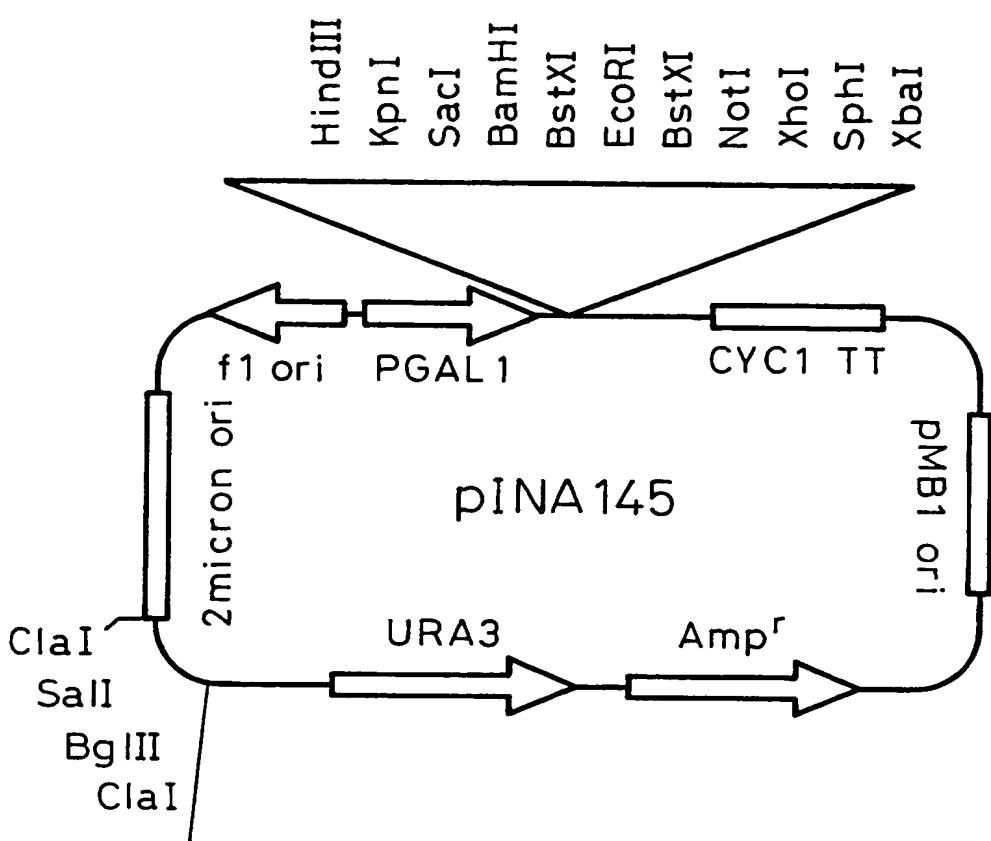
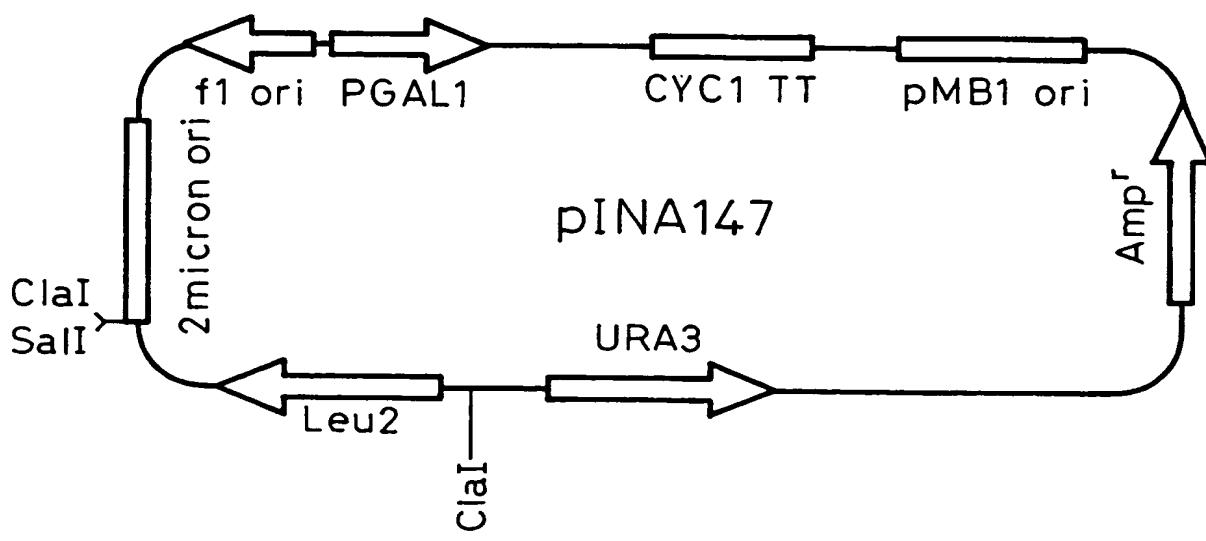


Fig.4



SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > SUNTORY LIMITED
< 1 2 0 > Gene coding for protein having an activity to control pH in vacuoles
< 1 3 0 > 994020
< 1 6 0 > 20
< 2 1 0 > 1
< 2 1 1 > 2237
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Ipomea nil
< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein having an activity to control pH in vacuoles
< 4 0 0 > 1

agaatgtagg ctacagaaat tttcagacag atagatacat aaatccgtat aatagagaca 60
gagaaacaga aaaagagaga gtcacgttaa tcctgagatt ttcctccatt tgtctgaagc 120
tcttcatcct tcaacactac ccccacatct caccttcaa gtgatttgta tgtttcggg 180
agggatttggaa atggcaacc cggatatgtg aacagaaacc acgacattgg gaaaagattt 240
attgcacaaa ttgtttgat tgtttgat tttgtggtag aaaaagggaa agaacaacaaa 299
atg gcg ttc ggg ttg tct ttc ctc caa aat tcg gat ttg ttc acg 347
Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr

1 5 10 15
tct gat cat gct tcc gtt gtg tcg atg aac ctc ttt gtg gcg ttg ctt 395
Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu

20 25 30
tgc gca tgc att gtt ctt ggc cat cta ctc gag gag aat cgc tgg gtg 443
Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val

35 40 45

aac gaa tcc att act gcc ctt ata att ggt ttg tgc acc gga gtt gta	491		
Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val			
50	55	60	
att ttg ctc ctt agc gga gga aag agt tca cat ctt ctc gtc ttt agc	539		
Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser			
65	70	75	80
gaa gat ctt ttc ttt ata tat ctc ctg cca cct ata ata ttc aat gcg	587		
Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Phe Asn Ala			
85	90	95	
ggg ttt caa gtg aaa aag aag cag ttt ttc gtg aac ttc atg aca att	635		
Gly Phe Gln Val Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile			
100	105	110	
atg ctg ttt gga gct att ggc aca ctt att agc tgt tct att ata tca	683		
Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser			
115	120	125	
ttt ggt gcg gtc aaa att ttc aag cac tta gac att gac ttt ctg gat	731		
Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp			
130	135	140	
ttt gga gat tat tta gca att ggt gcg ata ttt gct gca acc gat tct	779		
Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser			
145	150	155	160
gtt tgc aca ttg cag gtg ctc agt cag gat gag acg ccc cta ctt tac	827		
Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr			
165	170	175	
agt ctc gtg ttt gga gaa ggg gtc gtc aat gat gct aca tct gtg gtc	875		
Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val			
180	185	190	

ctt ttt aat gct att caa agt ttt gac atg act agt ttt gat cca aaa 923
 Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys
 195 200 205
 att ggg ctt cat ttc att gga aac ttc ttg tat tta ttt ctc tcg agc 971
 Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser
 210 215 220
 act ttt ttg ggc gtg gga att gga ctg ctt tgt gct tat att atc aaa 1019
 Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys
 225 230 235 240
 aag cta tac ttt ggc agg cac tca acc gat cgt gag gtt gcc ctt atg 1067
 Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met
 245 250 255
 atg ctc atg tct tac ttg tct tat ata atg gcc gag tta ttc tat cta 1115
 Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu
 260 265 270
 agc ggc ata ctt act gta ttc ttc tgt gga att gtc atg tct cat tat 1163
 Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr
 275 280 285
 acc tgg cac aat gtt acc gag agc tca agg gtc act act agg cat tcc 1211
 Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser
 290 295 300
 ttt gca act ctg tca ttt gtc gca gag aca ttt atc ttc ctc tat gtt 1259
 Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val
 305 310 315 320
 ggt atg gat gcc ttg gat atc gag aaa tgg aaa ttt gtg aaa aat agt 1307
 Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser
 325 330 335

cag gga cta tca gtt gca gtg agc tca ata ttg gta ggc cta atc tta 1355
 Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu
 340 345 350
 gta ggc aga gct gcg ttc gta ttc ccc ttg tcg ttt tta tcc aac tta 1403
 Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu
 355 360 365
 gca aag aaa aac tct tcg gac aag ata tcc ttt agg caa caa ata ata 1451
 Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile
 370 375 380
 att tgg tgg gct ggc cta atg aga ggc gcc gtc tca ata gca ctt gcg 1499
 Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala
 385 390 395 400
 tat aat aag ttt aca acc tcg ggg cat acg tca ttg cac gag aac gca 1547
 Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala
 405 410 415
 ata atg att aca agt act gtt acg gtt gtt ctg ttc agc aca gtt gta 1595
 Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val
 420 425 430
 ttc ggg ttg atg acg aag cct ctg ata aac ctt ctg cta ccc ccg cac 1643
 Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Pro Pro His
 435 440 445
 aag cag atg cca agc ggt cat tcg tca atg aca aca tcc gaa ccc agt 1691
 Lys Gln Met Pro Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser
 450 455 460
 agt ccg aag cac ttc acg gtg cca ctc ctg gac aac caa cct gac tca 1739
 Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser
 465 470 475 480

gaa agc gat atg ata acc gga cct gag gtt gct cga cca act gcc ttg 1787

Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu

485

490

495

cgc atg ctg cta agg acg cca acc cac acc gtg cac cgc tac tgg cgt 1835

Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg

500

505

510

aag ttt gat gat tcg ttt atg cgt ccc gtg ttt ggc ggg cgg gga ttc 1883

Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe

515

520

525

gtt ccg ttt gtc gcg ggc tca cca gtt gag cag agc cct aga tga 1928

Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg

530

535

540

ggtacaaagt acaaacaaga cactgttgct gggtgaaata gtgttagtt tatcatagtt 1988

gattctggtt gccccttta tgaaatgggc tgggtgaaag tcttctact agcttagttg 2048

cattgcattt ctacttcata aatgtttat ttatatttgt aaatgttggt gcattttagg 2108

tacttgtatt aacacctcat ttgtacata ttatggta cagagtattt ttttatgaa 2168

acaataatgg ctgaattatc aatttggctc tatgtttga tgcttagtaa aaaaaaaaaa 2228

aaaaaaaaaa

2237

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 542

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Ipomea nil

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an
activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 2

Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr

1

5

10

15

Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu

20 25 30

Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val

35 40 45

Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val

50 55 60

Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala

85 90 95

Gly Phe Gln Val Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile

100 105 110

Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser

115 120 125

Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp

130 135 140

Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser

145 150 155 160

Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val

180 185 190

Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys

195 200 205

Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser

210 215 220

Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys
 225 230 235 240
 Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met
 245 250 255
 Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu
 260 265 270
 Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr
 275 280 285
 Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser
 290 295 300
 Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val
 305 310 315 320
 Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser
 325 330 335
 Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu
 340 345 350
 Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu
 355 360 365
 Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile
 370 375 380
 Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala
 385 390 395 400
 Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala
 405 410 415
 Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val
 420 425 430

Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Leu Pro Pro His

435 440 445

Lys Gln Met Pro Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser

450 455 460

Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser

465 470 475 480

Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu

485 490 495

Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg

500 505 510

Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe

515 520 525

Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg

530 535 540

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 16

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI adaptor

< 4 0 0 > 3

gacgatgagt cctgag 16

< 2 1 0 > 4

< 2 1 1 > 14

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI adaptor

< 4 0 0 > 4

tactcaggac tcat 14

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 20

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > TIR primer

< 4 0 0 > 5

tgtgcatttt tcttgtatgt 20

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 16

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI primer

< 4 0 0 > 6

gatgagtcct gagtaa 16

< 2 1 0 > 7
< 2 1 1 > 19
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > TIR+N primer
< 4 0 0 > 7

tgtgcatttt tcttgtagn 19

< 2 1 0 > 8
< 2 1 1 > 17
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > MseI+N primer
< 4 0 0 > 8

gatgagtcct gagtaan 17

< 2 1 0 > 9
< 2 1 1 > 130
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 9

tgagcattt tcttgtatgt ctgagatttt cctccatttg tctgaagctc ttcatccttc 60

aacactaccc ccacatctca ccttcaagg tccaatcttt atcattcatc tttactcagg 120

actcatcgtc 130

< 2 1 0 > 10

< 2 1 1 > 26

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > PR-5 primer

< 4 0 0 > 10

gggatccaaac aaaaatggct gtcggg 26

< 2 1 0 > 11

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > PR-3 primer

< 4 0 0 > 11

gggtcgacta agcatcaaaa catagagcc 29

< 2 1 0 > 12

< 2 1 1 > 22

< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > CBSC1-linker
< 4 0 0 > 12
cgatagatct ggggtcgac at 22
< 2 1 0 > 13
< 2 1 1 > 22
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > CBSC2-linker
< 4 0 0 > 13
cgatgtcgac cccagatct at 22
< 2 1 0 > 14
< 2 1 1 > 2423
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Petunia hybrida
< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein
having an activity to control pH in vacuoles
< 4 0 0 > 14
attgcgccttc gtatttact gctgaatgaa atcgtgttt tttattcagt tcgttgttat 60
taatttcaga gttttttta ttaaagggtgt gtttggttga agaaattgta tttgctgaat 120

tttgcagaag	ttttgagtt	tttgctaaac	tattgtgaga	tctgatttg	aattttcca	180										
gtgggtttt	aagctcaatt	cgacgtcggt	tttactggaa	ttctgtatcg	taaatagggc	240										
tattttgatg	taaggttgtg	aaagttaca	gttggaaagt	ttagtttagtg	aaaaagggga	300										
aactttattg	tgatatttc	acaagtattt	ggtgaattca	ggttattgag	a atg gct	357										
Met Ala																
ttt	gat	ttt	ggg	acg	ttg	ttg	gga	aat	gta	gac	agg	tta	tcg	aca	tct	405
Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Asn Val Asp Arg Leu Ser Thr Ser																
5		10			15											
gat	cat	caa	tca	gtt	gtg	tcg	ata	aac	tta	ttc	gtt	gct	ctt	att	tgc	453
Asp His Gln Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu Ile Cys																
20		25			30											
gcg	tgt	att	gtg	atc	ggt	cat	ttg	ttg	gaa	gaa	aac	aga	tgg	atg	aat	501
Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn																
35		40			45								50			
gag	tcc	ata	act	gcc	tta	gtg	att	ggt	tct	tgt	act	gga	atc	gtt	att	549
Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Ile Val Ile																
55		60			65											
cta	ctg	ata	agt	gga	gga	aag	aac	tct	cat	att	tta	gtg	ttc	agt	gaa	597
Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe Ser Glu																
70		75			80											
gat	ctt	ttc	ttc	att	tac	ctt	ctt	ccg	cca	atc	att	ttt	aat	gct	ggg	645
Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly																
85		90			95											
ttc	cag	gtg	aaa	aag	aaa	tcg	ttc	ttc	cgc	aat	ttc	agc	act	atc	atg	693
Phe Gln Val Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr Ile Met																
100		105			110											

ctc	ttt	ggg	gca	ctt	ggc	acc	ttg	ata	tca	ttc	att	att	ata	tca	tta	741
Leu Phe Gly Ala Leu Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ser Leu																
115	120	125	130													
ggt	gcc	att	ggc	att	ttc	aag	aaa	atg	aat	att	gga	agc	ctt	gaa	att	789
Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asn Ile Gly Ser Leu Glu Ile																
135	140	145														
gga	gat	tac	ctt	gca	att	ggg	gca	atc	ttc	tct	gct	aca	gat	tct	gta	837
Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser Val																
150	155	160														
tgc	acc	tta	caa	gtg	ctt	aat	cag	gat	gaa	aca	ccc	tta	ttg	tac	agt	885
Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser																
165	170	175														
cta	gtt	ttt	ggg	gaa	ggt	gtg	aat	gat	gcc	aca	tct	gta	gtt	ctg	933	
Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu																
180	185	190														
ttc	aat	gct	atc	cag	aac	ttt	gac	tta	tct	cac	atc	gac	acg	ggc	aaa	981
Phe Asn Ala Ile Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Asp Thr Gly Lys																
195	200	205	210													
gct	atg	gaa	tta	gtt	gga	aac	ttt	cta	tac	ttg	ttt	gcc	tca	agc	act	1029
Ala Met Glu Leu Val Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser Ser Thr																
215	220	225														
gcc	cta	gga	gtt	gct	gct	ggc	cta	ctg	agc	gcc	tat	att	att	aaa	aaa	1077
Ala Leu Gly Val Ala Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys Lys																
230	235	240														
ctc	tac	ttt	gga	agg	cac	tca	act	gac	cgt	gag	gtt	gct	ata	atg	ata	1125
Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile Met Ile																
245	250	255														

ctc atg gct tac cta tct tac atg ctt gct gaa tta ttc tat tta agt	1173		
Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr Leu Ser			
260	265	270	
gca atc ctc act gtg ttt ttc tct ggg atc gtg atg tct cac tac acc	1221		
Ala Ile Leu Thr Val Phe Phe Ser Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr			
275	280	285	290
tgg cat aat gtg act gag agc tcg aga gtc act acc aag cac act ttt	1269		
Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Thr Phe			
295	300	305	
gct aca tta tca ttt att gct gaa ata ttc ata ttc ctt tat gtt ggt	1317		
Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr Val Gly			
310	315	320	
atg gat gct ttg gac att gag aag tgg aag ttt gta agc gac agc cct	1365		
Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp Ser Pro			
325	330	335	
gga ata tca gtt cag gtt agc tca ata ttg ctg ggt ctt gtt ttg gtt	1413		
Gly Ile Ser Val Gln Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu Val			
340	345	350	
gga aga gca gca ttt gtt ttc cca ttg tca ttc ttg tcc aac ttg acc	1461		
Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Thr			
355	360	365	370
aag aaa act cca gag gcg aaa att agt ttt aac cag cag gtt aca ata	1509		
Lys Lys Thr Pro Glu Ala Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val Thr Ile			
375	380	385	
tgg tgg gct gga ctt atg aga ggt gcc gtt tct atg gcc ctt gct tat	1557		
Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr			
390	395	400	

aat cag ttt acc agg gga ggt cat act cag tta cgc gca aat gca ata 1605
 Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn Ala Ile
 405 410 415
 atg atc aca agt act atc act gtt gtc ctt ttc agc aca gtc gtg ttt 1653
 Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe
 420 425 430
 ggg ttg atg aca aaa cct ttg att aga ata ttg cta ccc tca cac aaa 1701
 Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Ile Leu Leu Pro Ser His Lys
 435 440 445 450
 cac ttg agc aga atg atc tct tct gaa cca acg acc cca aaa tcc ttc 1749
 His Leu Ser Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Thr Thr Pro Lys Ser Phe
 455 460 465
 att gtg cca ctt ctt gac agc aca caa gac tca gaa gct gat ctg gaa 1797
 Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp Leu Glu
 470 475 480
 cgc cat gta ccc cgt ccc cac agt ttg cgg atg ctc ctt tca acc cca 1845
 Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser Thr Pro
 485 490 495
 tct cat aca gtg cat tat tac tgg aga aag ttt gac aat gca ttc atg 1893
 Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met
 500 505 510
 cgt cca gtt ttc ggt gga cga ggt ttt gta cct ttt gct cca gga tca 1941
 Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ala Pro Gly Ser
 515 520 525 530
 ccg aca gac cca gtt ggt gga aat ttg caa tgatggagat acagattgca 1991
 Pro Thr Asp Pro Val Gly Gly Asn Leu Gln
 535 540

aaaagtggc ttggtgaggg aagagggcag tttttggta atgaggttcc gttttctta 2051
 atgttaatag caagtgtggt taaaaagggg ttgtctagtt tataggttt gcagatctca 2111
 agtatattca ttgggtgat catgtttca gctcagttat tgctttggc cattgctgac 2171
 catcaatttc tgtgggaat tcctataagg tttctcccta acagttctt tcttcatctt 2231
 tttgcaattt atcgaaacac caaatggtg tatattctgt aagcttggc catacgtagc 2291
 ttaattgtct tgtaaaattt cctacagggtt agagattggc tcttgatatg tagatttcat 2351
 atgattgtaa cattcccatt tctcagaaaa gaaactataa tataaaattt ctggcggctg 2411
 tcgccccgtgc tc 2423

⟨ 2 1 0 ⟩ 15

⟨ 2 1 1 ⟩ 540

⟨ 2 1 2 ⟩ PRT

⟨ 2 1 3 ⟩ Petunia hybrida

⟨ 2 2 3 ⟩ Amino acid sequence of protein having an activity to control pH in vacuoles

⟨ 4 0 0 ⟩ 15

Met Ala Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Asn Val Asp Arg Leu Ser

5 10 15

Thr Ser Asp His Gln Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu

20 25 30

Ile Cys Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp

35 40 45

Met Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Ile

50 55 60

Val Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe

65 70 75 80

Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn

85 90 95

Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr

100 105 110

Ile Met Leu Phe Gly Ala Leu Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile

115 120 125

Ser Leu Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asn Ile Gly Ser Leu

130 135 140

Glu Ile Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp

145 150 155 160

Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu

165 170 175

Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val

180 185 190

Val Leu Phe Asn Ala Ile Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Asp Thr

195 200 205

Gly Lys Ala Met Glu Leu Val Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser

210 215 220

Ser Thr Ala Leu Gly Val Ala Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile

225 230 235 240

Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile

245 250 255

Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr

260 265 270

Leu Ser Ala Ile Leu Thr Val Phe Phe Ser Gly Ile Val Met Ser His

275 280 285

Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His

290 295 300

Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr
305 310 315 320
Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp
325 330 335
Ser Pro Gly Ile Ser Val Gln Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val
340 345 350
Leu Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn
355 360 365
Leu Thr Lys Lys Thr Pro Glu Ala Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val
370 375 380
Thr Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu
385 390 395 400
Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn
405 410 415
Ala Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val
420 425 430
Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Ile Leu Leu Pro Ser
435 440 445
His Lys His Leu Ser Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Thr Thr Pro Lys
450 455 460
Ser Phe Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp
465 470 475 480
Leu Glu Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser
485 490 495
Thr Pro Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala
500 505 510

Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ala Pro

515 520 525

Gly Ser Pro Thr Asp Pro Val Gly Gly Asn Leu Gln

530 535 540

< 2 1 0 > 16

< 2 1 1 > 2553

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Nierembergia hybrida

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein
having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 16

aattattatt atttctctcc aactctcatt tctcagttt ttgtgacttt ttcagagctt 60

gaagttcagt taattcattt tccaatatat tgattgtttt catttgagcg cgagaggatt 120

tcgtcttctc aatctgcttt caaatccttt ttgtttgtga tattcgatat tattcactca 180

gtttaccccta atatttcctc gcactttctg aattcgagtg cttaaagtg tttggattt 240

cgaaaagcgg aagaaaattc agcaaaaacg ctgttgctga atttgcagca gtttgagttt 300

ttgctaaata gctaagatct gattgaattt ttcactggtg cttataggga aattcgacgt 360

cgtttgact gcaatatttgc tccgtgattt ggactttgtt gaaattttgc tatttgaat 420

ttgaatgtaa gttgtcata gctttgccac tcggaaatac agtcagttagaaagaaaaaa 480

aactgtgttag tgtttttcc acaagtattt ggtgaatttga gtttcttcaa atg gcg 536

Met Ala

ttt gac ttt ggg act ctg ctg gga aag atg aac aac tta aca act tct 584

Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Lys Met Asn Asn Leu Thr Thr Ser

5 10 15

gat cat caa tca gtg gtg tcg gta aac ttg ttt gtt gca ctt att tgc 632

Asp His Gln Ser Val Val Ser Val Asn Leu Phe Val Ala Leu Ile Cys

20 25 30

gcg tgt att gtg atc ggt cat tta ttg gag gaa aac aga tgg atg aat	680		
Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn			
35	40	45	50
gag tcc ata act gcc ctt gtg att ggt agt tgc act gga gtc atc att	728		
Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Val Ile Ile			
55	60	65	
cta cta ata agt gga gga aag aac tca cat att tta gtg ttc agc gaa	776		
Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe Ser Glu			
70	75	80	
gat ctt ttc ttc att tac ctt ctt cca ccg atc att ttt aat gct ggg	824		
Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly			
85	90	95	
ttc cag gtg aaa aag aaa tca ttc ttc cgc aat ttc agt act atc atg	872		
Phe Gln Val Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr Ile Met			
100	105	110	
ctc ttt ggg gca gtt ggc acc ttg ata tcg ttc att att ata tca gcg	920		
Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile Ser Ala			
115	120	125	130
ggt gct att ggc att ttc aag aaa atg gat att gga cac ctt gaa att	968		
Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asp Ile Gly His Leu Glu Ile			
135	140	145	
gga gat tac ctt gca att gga gca atc ttt gct gca aca gat tct gta	1016		
Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Val			
150	155	160	
tgc acc tta caa gtg ctt aat cag gaa gaa aca ccg tta ttg tac agt	1064		
Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Glu Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser			
165	170	175	

ct a gt g tt g g a g g t g t g a a t g a t g c c a t c t g t a g t g c t g	1112		
Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu			
180	185	190	
tt c a a t g c t g c a g a a c t t g a c t t a t c t a t c a g c a c a g g c a a a	1160		
Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Ser Thr Gly Lys			
195	200	205	210
g c t c t g c a a t t g g a a a c t t t c t a t a c t t g t t t g c c t c g a g c a c t	1208		
Ala Leu Gln Leu Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser Ser Thr			
215	220	225	
t t c c t a g g g g t t g c t g t t g g c c t a c t a a g t g c c t t t a t a a t t a a g a a a	1256		
Phe Leu Gly Val Ala Val Gly Leu Leu Ser Ala Phe Ile Ile Lys Lys			
230	235	240	
c t c t a c t t t g g a a g g c a c t c g a c t g a t c g t g a g g t t g c t a t a a t g a t a	1304		
Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile Met Ile			
245	250	255	
c t c t a t g g c g t a c c t a t a c t a t g c t t g c t g a a t t a t c t a t t a a g t	1352		
Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr Leu Ser			
260	265	270	
g g a a t c c t c a c t g t g t t t c t g t g g g a t c g t g a t g t c t c a c t a t a c c	1400		
Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr			
275	280	285	290
t g g c a t a a t g t g a c t g a g a g c t c a a g a g t c a c t a c c a a g c a c g t t t	1448		
Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Thr Phe			
295	300	305	
g c t a c a t t a t c a t t t a t t g c t g a a a t a t t c a t a t t c c t t a t g t t g g t	1496		
Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr Val Gly			
310	315	320	

atg gat gct ttg gac att gag aag tgg aag ttt gta	agc gac agc ccc	1544	
Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val	Ser Asp Ser Pro		
325	330	335	
gga aca tca att aag gtc agc tca att ctg cta ggt	ctt gtt ttg gtt	1592	
Gly Thr Ser Ile Lys Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly	Leu Val Leu Val		
340	345	350	
gga agg gga gcc ttt gtt ttc ccc ttg tca ttc ttg	tcc aac ttg acc	1640	
Gly Arg Gly Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu	Ser Asn Leu Thr		
355	360	365	370
aag aaa aat cct gag gac aag att agc ttt aac cag	cag gtt aca ata	1688	
Lys Lys Asn Pro Glu Asp Lys Ile Ser Phe Asn Gln	Gln Val Thr Ile		
375	380	385	
tgg tgg gct ggg ctt atg cga ggt gct gtt tct atg	gcc ctt gct tat	1736	
Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met	Ala Leu Ala Tyr		
390	395	400	
aat cag ttt acc agg gga ggt cat act cag tta cgt	gcc aat gca ata	1784	
Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg	Ala Asn Ala Ile		
405	410	415	
atg atc acg agt act atc act gtt gtc ctt ttc agc	aca gtg gta ttt	1832	
Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser	Thr Val Val Phe		
420	425	430	
ggg ttg atg aca aaa cct tta att cta tta ttg	cta ccc tca caa aaa	1880	
Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Leu Leu Leu Pro	Ser Gln Lys		
435	440	445	450
cac ttg atc aga atg atc tcc tct gaa ccg atg	act cca aaa tcc ttc	1928	
His Leu Ile Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Met Thr	Pro Lys Ser Phe		
455	460	465	

att	gtg	cca	ctt	ctt	gac	agc	aca	caa	gac	tca	gaa	gct	gat	ctg	ggc	1976
Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp Leu Gly																
470					475									480		
cga	cat	gta	ccc	cgt	ccc	cac	agt	ttg	cgg	atg	ctc	ctg	tca	acc	cca	2024
Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser Thr Pro																
485					490									495		
tct	cac	acg	gta	cat	tac	tac	tgg	aga	aaa	ttt	gac	aat	gca	ttc	atg	2072
Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met																
500					505									510		
cgt	cct	gtt	ttc	ggt	gga	cga	ggt	ttt	gta	cct	ttt	gtt	cca	gga	tca	2120
Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Val Pro Gly Ser																
515					520						525			530		
cct	act	gaa	ccg	gtc	gaa	ccg	acc	gaa	cca	aga	cca	gcc	gaa	tca	aga	2168
Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Thr Glu Pro Arg Pro Ala Glu Ser Arg																
535					540									545		
cca	acc	gaa	cca	act	gat	gag	tgattacact	gatggagatg	caggttgcac						2219	
Pro Thr Glu Pro Thr Asp Glu																
550																
taaagtccca	ctggccttgg	agaaggacga	aggcagttt	ttgggtttga	ggttttgttt										2279	
actgttaata	gttttcgaat	gtggtaaaa	aagggttgtc	tagttttat	atataggcgtc										2339	
cagatacgt	atttcagctc	agttcccgag	gtgaaccct	tagagtttt	cttcctgacg										2399	
gtttttcttc	ttttttgtaa	tttatcaaaa	acaccaaatg	ggtgtatatt	ctttaagctt										2459	
gtagcttaat	taccttataa	gcatgtggta	gcgttcgtgt	aatatgtaaa	atttccattg										2519	
ccagaaaaga	aacttccata	caatatttct	gccg												2553	
< 2 1 0 > 17																
< 2 1 1 > 553																
< 2 1 2 > PRT																

< 2 1 3 > Nierembergia hybrida

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 17

Met Ala Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Lys Met Asn Asn Leu Thr

5

10

15

Thr Ser Asp His Gln Ser Val Val Ser Val Asn Leu Phe Val Ala Leu

20

25

30

Ile Cys Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp

35

40

45

Met Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Val

50

55

60

Ile Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe

65

70

75

80

Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn

85

90

95

Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr

100

105

110

Ile Met Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile

115

120

125

Ser Ala Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asp Ile Gly His Leu

130

135

140

Glu Ile Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp

145

150

155

160

Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Glu Glu Thr Pro Leu Leu

165

170

175

Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val

180 185 190

Val Leu Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Ser Thr

195 200 205

Gly Lys Ala Leu Gln Leu Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser

210 215 220

Ser Thr Phe Leu Gly Val Ala Val Gly Leu Leu Ser Ala Phe Ile Ile

225 230 235 240

Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile

245 250 255

Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr

260 265 270

Leu Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His

275 280 285

Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His

290 295 300

Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr

305 310 315 320

Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp

325 330 335

Ser Pro Gly Thr Ser Ile Lys Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val

340 345 350

Leu Val Gly Arg Gly Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn

355 360 365

Leu Thr Lys Lys Asn Pro Glu Asp Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val

370 375 380

Thr Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu
385 390 395 400
Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn
405 410 415
Ala Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val
420 425 430
Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Leu Leu Leu Pro Ser
435 440 445
Gln Lys His Leu Ile Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Met Thr Pro Lys
450 455 460
Ser Phe Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp
465 470 475 480
Leu Gly Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser
485 490 495
Thr Pro Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala
500 505 510
Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Val Pro
515 520 525
Gly Ser Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Thr Glu Pro Arg Pro Ala Glu
530 535 540
Ser Arg Pro Thr Glu Pro Thr Asp Glu
545 550
< 2 1 0 > 18
< 2 1 1 > 2361
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Torenia hybrida
< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein

having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 18

gttggagatt ccgagctgca gcatcacctt gcttatgtaa gctttaaaag tatcagaatt	60
gaatatcgac cactggaaag tgttttagga ctggattct tatctattga gcttggttga	120
aggtaaaaaa aggctcgatc tcgttcctct atagttggtt ttctggagtt gcaagcgact	180
ctactcgaa tctttccg ctttattgga agctctgctt tactaaaaaa agtttgtctt	240
tttatctctg attcatcata aaatctgcgg gagattcaga agcggagatc tggtgcccag	300
agcaggagtt tcaactttga gcccgttat attataaac aaattccgag tccaaagatt	360
gaactttgaa ataatcaaataatcaagcaa gcaat atg ggg ttt gaa tct gta	413

Met Gly Phe Glu Ser Val

5

att aag cta gcg gca agt gaa act gac aat ttg tgg agc tct ggt cac	461
Ile Lys Leu Ala Ala Ser Glu Thr Asp Asn Leu Trp Ser Ser Gly His	

10 15 20

ggt tca gtg gtc gct ata acc tta ttt gtc act ctt ctc tgc aca tgt	509
Gly Ser Val Val Ala Ile Thr Leu Phe Val Thr Leu Leu Cys Thr Cys	

25 30 35

ata gtg att ggt cat ctt ctg gag gaa aac cgt tgg atg aat gaa tct	557
Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn Glu Ser	

40 45 50

atc att gcc ctc ata att ggt tta gcc acg gga gtt ata atc ctg tta	605
Ile Ile Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ala Thr Gly Val Ile Ile Leu Leu	

55 60 65 70

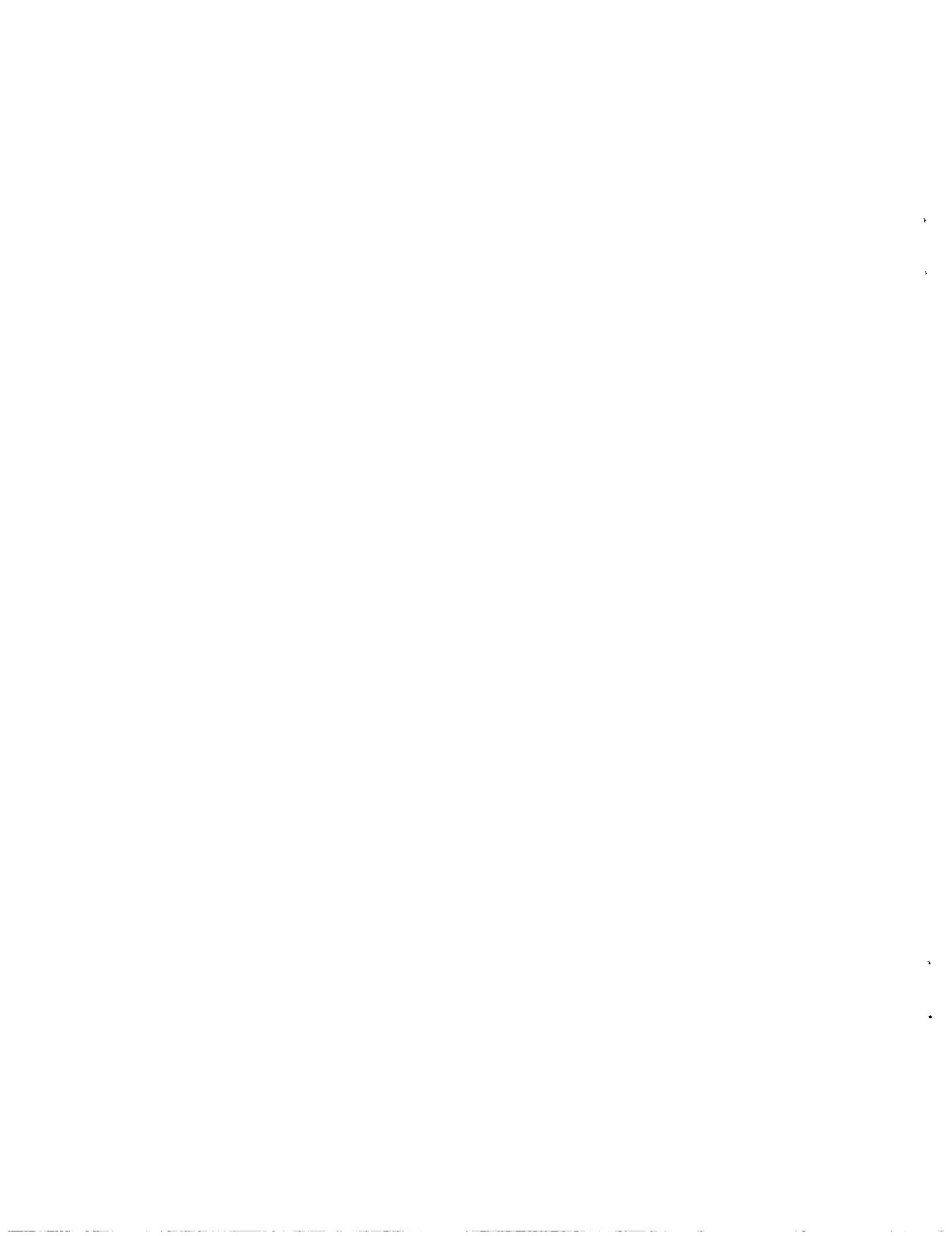
ata agt ggt gga aaa agc tcc cat ctc ttg gtg ttc agt gag gat ctt	653
Ile Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser Glu Asp Leu	

75 80 85

ttc ttc atc tat gcg ctg cca cca atc att ttt aat gcg ggg ttc caa	701	
Phe Phe Ile Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly Phe Gln		
90	95	100
gta aaa aag aaa tca ttc ttt cgc aat ttc gca act ata atg atg ttt		749
Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ala Thr Ile Met Met Phe		
105	110	115
gga gca gtt ggt acc ttg ata tcc ttc atc atc att tca ctc ggt aca		797
Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile Ser Leu Gly Thr		
120	125	130
att gca ttc ttc ccc aaa atg aac atg aga ctt gga gtt gga gat tat		845
Ile Ala Phe Phe Pro Lys Met Asn Met Arg Leu Gly Val Gly Asp Tyr		
135	140	145
ctt gct att gga gct att ttt gct gca aca gac tca gtt tgc aca tta		893
Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Val Cys Thr Leu		
155	160	165
cag gtg cta agc cag gac gaa aca cca ctg ttg tac agt cta gtg ttt		941
Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser Leu Val Phe		
170	175	180
ggc gag ggt gtt gta aat gac gcg act tca gtg gtc cta ttt aat gca		989
Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu Phe Asn Ala		
185	190	195
gta cag aac ttc gac ctg cct cat atg tct act gct aaa gct ttc gag		1037
Val Gln Asn Phe Asp Leu Pro His Met Ser Thr Ala Lys Ala Phe Glu		
200	205	210
ctt gtt gga aac ttc ttt tat tta ttt gct aca agc act gtg ctg ggt		1085
Leu Val Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Ala Thr Ser Thr Val Leu Gly		
215	220	225
2 9 / 3 9		

gtt	ctg	act	gga	ttg	ctt	agt	gca	tac	atc	ata	aaa	aag	ctc	tat	ttt	1133
Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ile	Ile	Lys	Lys	Leu	Tyr	Phe	
									235		240			245		
gga	agg	cac	tcc	act	gat	cgc	gag	gtt	gcc	ata	atg	ata	ctc	atg	gct	1181
Gly	Arg	His	Ser	Thr	Asp	Arg	Glu	Val	Ala	Ile	Met	Ile	Leu	Met	Ala	
									250		255			260		
tat	ctg	tcg	tat	atg	tta	gct	gaa	tta	ttc	gat	ttg	agc	ggt	atc	ctc	1229
Tyr	Leu	Ser	Tyr	Met	Leu	Ala	Glu	Leu	Phe	Asp	Leu	Ser	Gly	Ile	Leu	
									265		270			275		
acc	gtg	ttc	ttc	tgt	gga	att	gtg	atg	tcg	cac	tat	aca	tgg	cac	aat	1277
Thr	Val	Phe	Phe	Cys	Gly	Ile	Val	Met	Ser	His	Tyr	Thr	Trp	His	Asn	
									280		285			290		
gtc	act	gaa	aac	tca	aga	gtt	acc	acc	aag	cat	aca	ttt	gcg	aca	ttg	1325
Val	Thr	Glu	Asn	Ser	Arg	Val	Thr	Thr	Lys	His	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	
									295		300			305		310
tca	ttt	gtt	gct	gaa	ata	ttt	ata	ttt	ctg	tat	gtt	ggc	atg	gat	gct	1373
Ser	Phe	Val	Ala	Glu	Ile	Phe	Ile	Phe	Leu	Tyr	Val	Gly	Met	Asp	Ala	
									315		320			325		
tta	gac	att	gag	aaa	tgg	aga	ttc	gta	agc	ggc	agc	atg	aca	aca	tct	1421
Leu	Asp	Ile	Glu	Lys	Trp	Arg	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Met	Thr	Thr	Ser	
									330		335			340		
gca	gct	gtc	agt	gca	act	ctg	ctg	gga	ttg	gtt	ttg	ctc	tca	aga	gca	1469
Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Ala	
									345		350			355		
gcc	ttt	gta	ttc	cct	tta	tca	ttt	ctc	tcc	aat	ctg	gcc	aaa	aag	tcc	1517
Ala	Phe	Val	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	Ala	Lys	Lys	Ser	
									360		365			370		

cca ctc gaa aaa atc agt ctc agg cag caa att ata ata tgg tgg gct 1565
 Pro Leu Glu Lys Ile Ser Leu Arg Gln Gln Ile Ile Ile Trp Trp Ala
 375 380 385 390
 ggt ctt atg cgc gga gcc gtt tcc atg gct ctt gct tac aag cag ttt 1613
 Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr Lys Gln Phe
 395 400 405
 act aga gaa ggt ctc aca gtg gaa cgt gaa aat gcc ata ttc atc acc 1661
 Thr Arg Glu Gly Leu Thr Val Glu Arg Glu Asn Ala Ile Phe Ile Thr
 410 415 420
 agt aca atc acc att gtg ctc ttc agc act gtg gtg ttt ggt ttg atg 1709
 Ser Thr Ile Thr Ile Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe Gly Leu Met
 425 430 435
 acg aag ccc ctc atc aat tta ctg ata ccc tca cca aag ctt aac aga 1757
 Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Ile Pro Ser Pro Lys Leu Asn Arg
 440 445 450
 tcg gtc tct tca gaa ccg ctg act cca aac tcc atc aca atc cca ctt 1805
 Ser Val Ser Ser Glu Pro Leu Thr Pro Asn Ser Ile Thr Ile Pro Leu
 455 460 465 470
 ctc ggg gaa agt cag gac tct gtg gcc gaa cta ttc agc atc aga ggt 1853
 Leu Gly Glu Ser Gln Asp Ser Val Ala Glu Leu Phe Ser Ile Arg Gly
 475 480 485
 caa act tca caa ggt ggc gaa ccc gtt gct cga ccg agc agc cta cgc 1901
 Gln Thr Ser Gln Gly Glu Pro Val Ala Arg Pro Ser Ser Leu Arg
 490 495 500
 atg tta ctc aca aag ccc act cat acg gtg cac tat tat tgg aga aaa 1949
 Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys
 505 510 515



ttc gac aat gct ttt atg cgt ccg gtc ttt ggt ggg cgt ggc ttt gta 1997

Phe Asp Asn Ala Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val

520 525 530

cca tat gtt ccc ggt tca ccg act gaa cga agc gtt cgc aac tgg gaa 2045

Pro Tyr Val Pro Gly Ser Pro Thr Glu Arg Ser Val Arg Asn Trp Glu

535 540 545 550

gaa gag acc aaa cag taaaaagatt ttcttgtgt aatgatggtg aagagattag 2100

Glu Glu Thr Lys Gln

555

attcttgga tattcgttt tcttatttct aatgtgtcac ctggaaagtt gttgaatgaa 2160

attatattat cgtctggttt tcgactttgc gcttgtggaa ggaatatttc ttctggattt 2220

tgcatggaaa cctcaatgat aggggggtgtg atattttgt tagaaactga gtcgtttgat 2280

gtatattgtt ggtaatgcag ctgggtttt tttgtatgt atagtcatca agtgtgtatt 2340

tattcatatt gttatgcagt c 2361

< 2 1 0 > 19

< 2 1 1 > 555

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Torenia hybrida

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 19

Met Gly Phe Glu Ser Val Ile Lys Leu Ala Ala Ser Glu Thr Asn

5 10 15

Leu Trp Ser Ser Gly His Gly Ser Val Val Ala Ile Thr Leu Phe Val

20 25 30

Thr Leu Leu Cys Thr Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn

35 40 45

Arg Trp Met Asn Glu Ser Ile Ile Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ala Thr

50 55 60

Gly Val Ile Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu

65 70 75 80

Val Phe Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Ile

85 90 95

Phe Asn Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe

100 105 110

Ala Thr Ile Met Met Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile

115 120 125

Ile Ile Ser Leu Gly Thr Ile Ala Phe Phe Pro Lys Met Asn Met Arg

130 135 140

Leu Gly Val Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr

145 150 155 160

Asp Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu

165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser

180 185 190

Val Val Leu Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Pro His Met Ser

195 200 205

Thr Ala Lys Ala Phe Glu Leu Val Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Ala

210 215 220

Thr Ser Thr Val Leu Gly Val Leu Thr Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ile Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala

245 250 255

Ile Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe

260 265 270

Asp Leu Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser

275 280 285

His Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Asn Ser Arg Val Thr Thr Lys

290 295 300

His Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu

305 310 315 320

Tyr Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Arg Phe Val Ser

325 330 335

Gly Ser Met Thr Thr Ser Ala Ala Val Ser Ala Thr Leu Leu Gly Leu

340 345 350

Val Leu Leu Ser Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser

355 360 365

Asn Leu Ala Lys Lys Ser Pro Leu Glu Lys Ile Ser Leu Arg Gln Gln

370 375 380

Ile Ile Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala

385 390 395 400

Leu Ala Tyr Lys Gln Phe Thr Arg Glu Gly Leu Thr Val Glu Arg Glu

405 410 415

Asn Ala Ile Phe Ile Thr Ser Thr Ile Thr Ile Val Leu Phe Ser Thr

420 425 430

Val Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Ile Pro

435 440 445

Ser Pro Lys Leu Asn Arg Ser Val Ser Ser Glu Pro Leu Thr Pro Asn

450 455 460



Ser Ile Thr Ile Pro Leu Leu Gly Glu Ser Gln Asp Ser Val Ala Glu
 465 470 475 480

Leu Phe Ser Ile Arg Gly Gln Thr Ser Gln Gly Gly Glu Pro Val Ala
 485 490 495

Arg Pro Ser Ser Leu Arg Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His Thr Val
 500 505 510

His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met Arg Pro Val Phe
 515 520 525

Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Tyr Val Pro Gly Ser Pro Thr Glu Arg
 530 535 540

Ser Val Arg Asn Trp Glu Glu Glu Thr Lys Gln
 545 550 555

< 2 1 0 > 20

< 2 1 1 > 6298

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Ipomea nil

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of promoter region of gene
 coding for protein having an activity to control
 pH in vacuoles

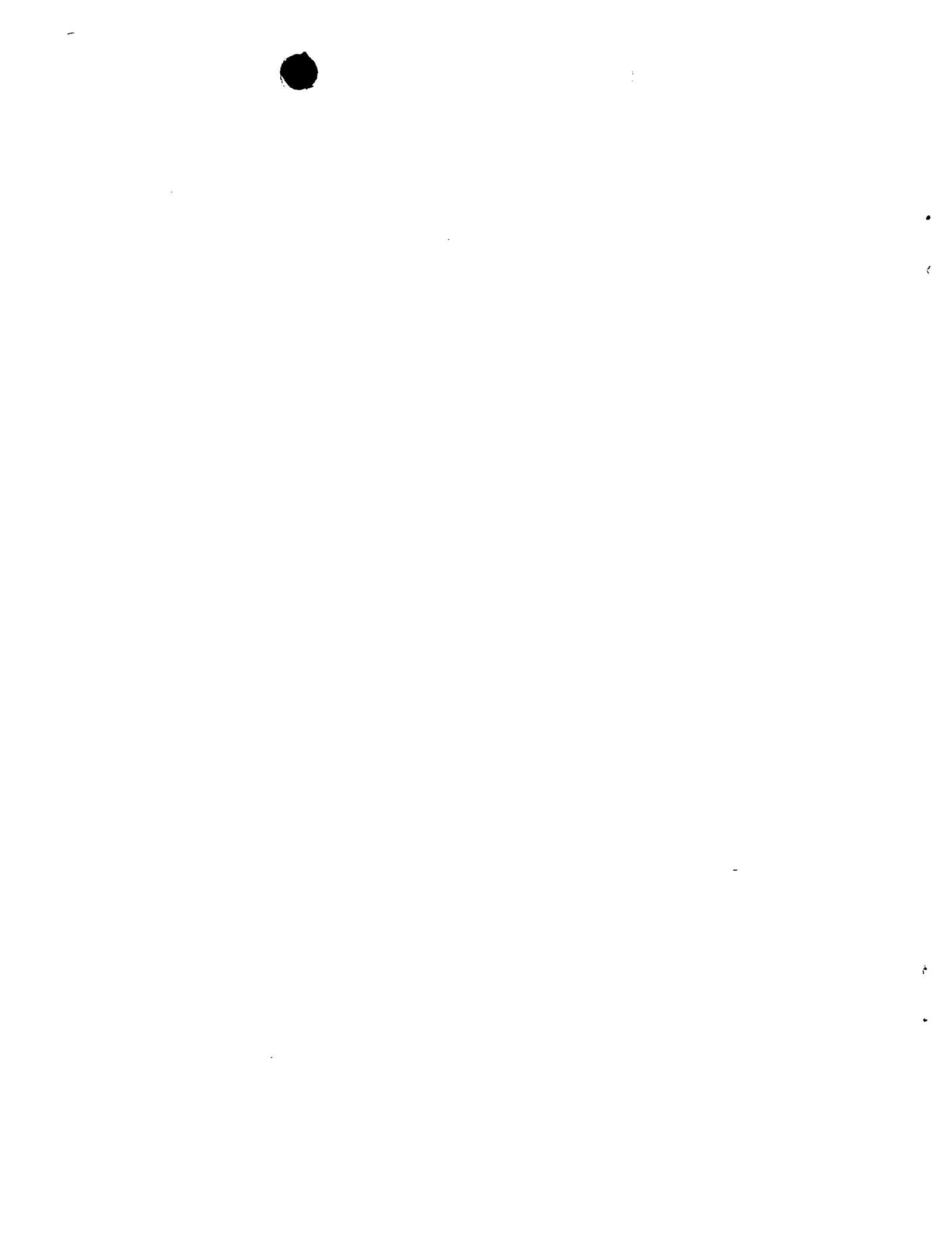
< 4 0 0 > 20

gatctcagtc tgtggatgtc ctagagacat tcatattga agttgagagt tagctaaata 60
 gaaaggtaaa gacaattgga tcatataaag gtgatgagta ttatggaaa ccatcaaaag 120
 ttgggcaaat tcccgcccc ttaaagaat tcctcgaatc taaaggcatt tgtcataat 180
 acacaatgtc aggcacacca caacaaaatg gtgtggaaga aaggtgaaat cgtactctaa 240
 gggaaatggt taggagttag gtaaataatt gtacattgct tgttcattg tggatatatg 300
 cattaaaaac aacagcatac ttactcaata gggttcctag taaggttgtt ttttaaaaca 360
 ccttatgaac tgtggacaag aaggaaacct agtttgagac atcttcacat tcagggttgt 420

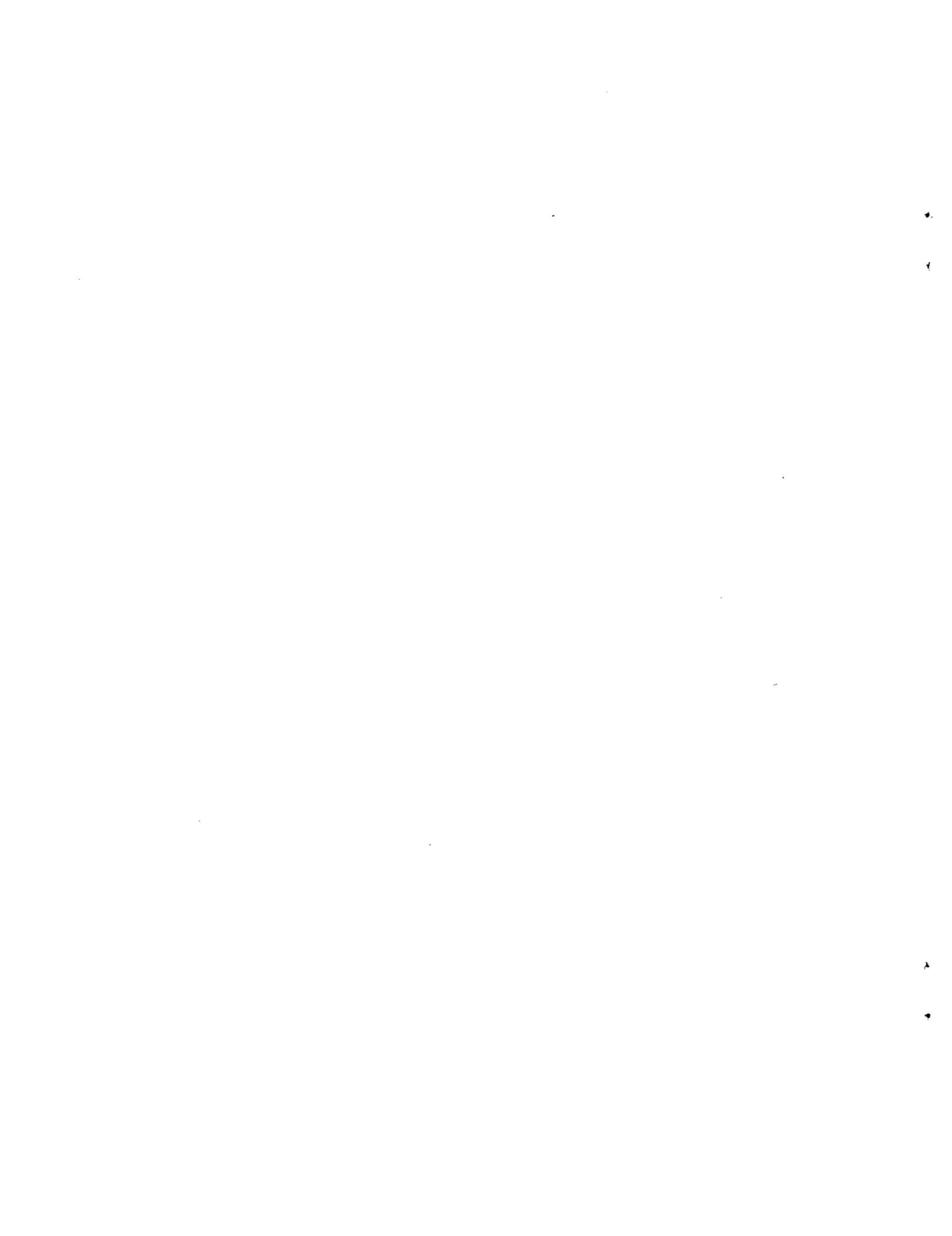
caagctggag tgatgatata taatccacat gaaaataaat tatggatatc cagaaccatt 480
aatggttatt tcattggata tccagaaagg tctaaaggta catgtttatt gtcctaata 540
taagtacgag gattgtttag tctggtaatg ctcgcttcat taaaatggc gaagtcagtg 600
ggagtgtggg agctcgtaat gttaaaatta aggagtattt gatggttcta gattcatcaa 660
gtgatccctt ttcctgttg ttgttcctat tggtgcagtg cagtgttagcc ttatggaaat 720
actttgaaac aacagcaact agatgctaa attccacatg aggaagctat tgtaaatgaa 780
gatgagggtt gaaactcaaga tgatgatcaa gtgaaatctc agcaggaagt gacattaagg 840
aggctacta tagatagaaa agatcaacca ttcttgatga ctatattgtt tatacacttg 900
agcattgata attatccagt ctcatttaac caagccatac aggataataa ttctccttga 960
ggattatttt ggtttgggt gctcattctg ttcttgagct ccaccaaattt gttttaaaa 1020
ttaccttctt gaatggtaaa taaaagagg aagtatacat ggattagccg taaggcttca 1080
tggccacagg aaaggaaaat ctggatgtt gattgaagat gtcgatctat ggattaaaac 1140
atgcttctag acaatggtaat ttgagattgt cattgggtt tgtagagatc actgttgatc 1200
ggtgatcca cataaaggaa taatggaagc aagtttgtaa tcctagtatt acatgttaac 1260
gacattcttc ttgctgctaa taataaaagg gatgttgcgt gatgttaagg aatagcttcc 1320
taagaacttt gaaatgaagg atatgggtga gacttcata gttgattggaa taagaaatata 1380
tccgtaatag atcacatggg attttaggtt catcctagaa gactcacatt aacaaagttt 1440
tagaaagata caaaactggaa atctgcaaag agggctctgt gatacttaca aggactaag 1500
gaccacatgc tcacctataa aatgaacgaa taacctagag gttataggtt attcgattc 1560
agactatgcc ggtatgttgg atacccgaaa atccacattc gaatataattt ttccacttgc 1620
tcgtggagca atatcttggta tgagtgtgaa ggagcctgtc attgctactt ccactataag 1680
ggcagaattt gtagcatgct ttgaggctag tagacactat aaaaattggc tgccttgtgc 1740
caacatcatt tgcattccagc tataagcatc tccattttcg aacatcattc gattcttata 1800
gctggatgaa gatgattcac tgcactttgg ttgcattttg aagctgcgt tgctatcgaa 1860
aacaataaac ctatctataat aaaacaaacg acttagattt aggaataag aaggaagata 1920
cttttttaa aatccaaaaa ttacctttta ggtttgacct gcaaataaca cttaagatc 1980
aaatcagata aatgtcata atcaatgatc aaattgaata atttagtag tcgaggatca 2040



aatttgtaaa atccccatag tcgagggact aaaccagtaa tttctcgcg tttgaacgtt 2100
tgtccgaaaa ttggcattag cgatagctta attgagttt tcaattctct aatttttaa 2160
attttgttc ttcataaaaat ctttcacttt ttcactttgc taatattttg ccgaatttat 2220
aatatttcca atttctaaag tagcagaacc ccagacgttgc aactgccaat ttttttttt 2280
gtttttgttt ttgtttttt tatttcctta tccctccacc tcatttgaa gttaaattatt 2340
attattaattt cattaatttt taaaatagag agactgcatt aacacaaaat tagccaaattt 2400
ggtagcagaa ttaaatttaa acaaacaagt tggttaatg taattttgtt caatttaattt 2460
tctctatttt tggacaaaaaa ttaggttagac ttattaaattt aaataaacat gtttggtaa 2520
ttttaacttct tctacctaag tttgtgtcaa ttcagtctct ctatttata aattaatgaa 2580
tggtaaata taacttataa gtgcattgtg tccaaatgtat cacaagagttt aggccaaactt 2640
ctttttcat ataggtgattt ctttttcga gtattacgtt cacttcagtc ttgtcaacta 2700
acacttagaa tttagttgtc atttcgaac ataggtgtca actaagttt gtagccacta 2760
tatagcacat gtattccaag agatttaatc tcattcatca tgacaacttc tctaccaattt 2820
ctttgctcaa tcttttagttt agcgaattcg ctatattatc ctataactttt cagtagtc 2880
aacaaaaataa aaatgtattt caagaaacta tttaatagtatg tatgttatgtt atatgtccta 2940
tatgtctaga cttaccgtta tacatattac taatttacta tatgtccttc caattgcgaa 3000
ttgactatcg taatgcatac atattggaga tatatattttt ttctaggggtt aaatgcaggt 3060
tggatcgacc cattaggcct gccccaaacgc aaactttttt tgtcggcctt ttgcggaccg 3120
gcttgcgggt tagaaaatac acagcccaag cccgtccatg cgggctcgcc ggccttattt 3180
caaaaaaaaaaaa aaaaatacta cgtatttttca tatttttta tattcaaata gtctaata 3240
aataaaataaa aaaatcggtt ttgaaaatta ctttttttt tatatataattt ttttaaaattt 3300
ttaatgttat atacgaagtgc tttgttaatat atatataat atatataat atatataat 3360
atatataat atatataat attatttata ttattttat ttatgtttat atttaaaatac 3420
gggcattggct cgtcggttgg tccgttaggtt ccgtctttt gtaggcattt ttttgtgtg 3480
accctaaatc gtctcaccgc gggacaagta tagggcagct tgcggacttc ggtccattttt 3540
gacatata tataatata tataatata tataatata tataatata tataatata 3600
tataatata taacattaaa attttttttt ttttaaacat gaaaaaaattt 3660



tgtacaaaaa aaacttaacg aaaaaaacaa acataaataa ggggtataac tttcattcac 5340
acttattatg ttttagatt agattnaacc atacatgcat taattgtaa aatagcgaga 5400
gtgaattaac acaaaattag gtagaagaag taaaattaaa caaacatgtt tatttaattt 5460
aacaagtcca cctaattttt gtccaaaaat agagaaatta aattgacaaa aattacatta 5520
aacaacttg ttttttaaa ttgaattctt ctacctaatt ggctaattt gtgttaatgc 5580
agtctctcta ttttaaaaat taatgaatta ataataataa ttaacttcaa aatgagggtgg 5640
agggataagg aaataaaaaaaa acaaaaaaca aaaacaaaaaa aaaaaaatttgcagttcaac 5700
gtctgggtt ctgctacttt aaatactgat aggagagttg tcgttcattt tacaagtattt 5760
aaggatgtac acgtattttag aatgtaggct acagaaattt tcagacagat agatacataa 5820
atccgtataa tagagacaga gaaacagaaa aagagagagt cacgttaatc ctgagatttt 5880
cctccatttg tctgaagctc ttcatccttc aacactaccc ccacatctca ccttcagg 5940
tccaatctt atcattcatc ttaatttcc agctctatct tgggatttgc atgtaaattt 6000
tatttatttt tcgggtttct gttccgatc ttatgcttt gttccaaagg gtatttgattt 6060
tcatatatta tgagtttgc atgcattttc tctttgtaa aatgaaagaa aatttgagat 6120
attgggtgggt ttgatctgaa agtttgggttgc tttgcagtga tttgtatgtt ttcgggaggg 6180
attggaaatgg gcaacccgga tatgtgaaca gaaaccacga cattggaaa agatttattt 6240
caaaaatgt tttgattgtt ttggatttttgc tggtagaaaaa agggaaagaa caaaaatgt 6298



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05722

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00,
C12P 21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00,
C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq, PIR/SwissProt

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.) 27.10月.1994 (2 7.10.94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A	1, 7-14
A	Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na ⁺ / H ⁺ exchanger gene in Oryza sativa" Biochim. Biophys. Acta (1999, Jul.) 第1446巻 p. 149-155	1-14
A	Gaxiola, A. R. et al. "The Arabidopsis thaliana proton transport ers, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999, Feb.) 第96巻	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
	p. 1480-1485	
A	Lu, P. Y. et al. "AtMRP1 gene of <i>Arabidopsis</i> encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 第94巻 p. 8243-8248	1-14
A	Marrs, A. K. et al. "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995) 第375巻 第6530号 p. 397-400	1-14
T	Tanaka, S. et al. "Colour-enhancing protein in blue petals" Nature (2000, Oct.) 第407巻 p. 581	1-14

PARENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:
 ISHIDA, Takashi
 A. Aoki, Ishida & Associates
 Toranomon 37 Mori Building
 5-1, Toranomon 3-chome
 Minato-ku
 Tokyo 105-8423
 JAPON

15

Date of mailing (day/month/year) 01 March 2001 (01.03.01)			
Applicant's or agent's file reference H794-PCT		IMPORTANT NOTICE	
International application No. PCT/JP00/05722	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)	
Applicant SUNTORY LIMITED et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,EP,JP,NZ

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 01 March 2001 (01.03.01) under No. WO 01/14560

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

0	受理官庁記入欄 国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国 際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されること を請求する。	
0-6	出願人によって指定された受 理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	H794-PCT
1	発明の名称	液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子
II	出願人 II-1 この欄に記載した者は II-2 右の指定国についての出願人で ある。	出願人である (applicant only) 米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	サントリー株式会社
II-4en	Name	SUNTORY LIMITED
II-5ja	あて名:	530-8203 日本国 大阪府 大阪市北区 堂島浜2丁目1番40号
II-5en	Address:	1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者 III-1-1 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人で ある。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	飯田 滋
III-1-4en	Name (LAST, First)	IIDA, Shigeru
III-1-5ja	あて名:	444-0874 日本国 愛知県 岡崎市 竜美南2-4-1-3-21
III-1-5en	Address:	2-4-1-3-21, Tatsumi-minami, Okazaki-shi, Aichi 444-0874 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP



特許協力条約に基づく国際出願願書
原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人で ある。	田中 幸子 TANAKA, Sachiko 444-0802 日本国 愛知県 岡崎市 美合町五本松 6 1 番地 61, Gohonmatsu, Miei-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-0802
III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	Japan 日本国 JP
III-2-5en	Address:	日本国 JP
III-2-6 III-2-7	国籍(国名) 住所(国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2 III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	右の指定国についての出願人で ある。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	稻垣 善茂 INAGAKI, Yoshishige 444-0851 日本国 愛知県 岡崎市 久後崎町宮下2 城南ハイツ105 Jonanhaitsu 105, 2, Miyashita, Kugosaki-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-0851 Japan 日本国 JP
III-3-5en	Address:	日本国 JP
III-3-6 III-3-7	国籍(国名) 住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通 知のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動 する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	代理人 (agent) 石田 敬 ISHIDA, Takashi 105-8423 日本国 東京都 港区虎ノ門 三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 A. AOKI, ISHIDA & ASSOCIATES Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8423 Japan 03-5470-1900 03-5470-1911
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja		
IV-1-2en	Address:	
IV-1-3 IV-1-4	電話番号 ファクシミリ番号	



特許協力条約に基づく国際出願願書

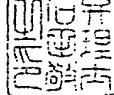
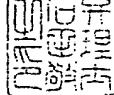
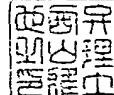
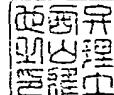
原本 (出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 鶴田 準一; 福本 積; 西山 雅也 TSURUTA, Junichi; FUKUMOTO, Tsumoru; NISHIYAMA, Masaya	
V-1	国々の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国	
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AU CA JP NZ US	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権 主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年08月24日 (24.08.1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-236800号	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	5	-
VIII-2	明細書 (配列表を除く)	19	-
VIII-3	請求の範囲	2	-
VIII-4	要約	1	styh794.txt
VIII-5	図面	3	-
VIII-6	明細書の配列表	39	-
VIII-7	合計	69	



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるカレオット及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	石田 敬	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	鶴田 準一	
IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	福本 積	
IX-4	提出者の記名押印		
IX-4-1	氏名(姓名)	西山 雅也	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用）- 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

H794-PCT

国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,
C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,
C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, PIR/Swissprot

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.), 27 October, 1994 (27.10.94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A	1, 7-14
A	Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na ⁺ /H ⁺ exchanger gene in Oryza sativa" Biochim. Biophys. Acta (July, 1999), Vol. 1446, pp.149-155	1-14
A	Gaxiola, A.R. et al. "The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (February, 1999), Vol. 96, pp.1480-1485	1-14
A	Lu, P. Y. et al., "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene," Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997), Vol. 94, pp.8243-8248	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 November, 2000 (27.11.00)	Date of mailing of the international search report 05 December, 2000 (05.12.00)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05722

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Marrs, A. K. et al., "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995), Vol. 375, No.6530, pp.397-400	1-14
T	Tanaka, S. et al., "Colour-enhancing protein in blue petals," Nature (October, 2000), Vol.407, p.581	1-14

特許協力条約

E.P.

U.S.

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	H 7 9 4 - P C T		今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05722	国際出願日 (日.月.年)	24.08.00	優先日 (日.月.年)	24.08.99
出願人 (氏名又は名称) サントリー株式会社				

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、スクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している (第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。
 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである. なし
 出願人は図を示さなかった。
 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00;
C12P 21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00,
C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq, PIR/Swissprot

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.) 27.10月.1994 (2 7.10.94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A	1, 7-14
A	Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na+/ H+ exchanger gene in Oryza sativa" Biochim. Biophys. Acta (1999, Jul.) 第1446巻 p. 149-155	1-14
A	Gaxiola, A. R. et al. "The Arabidopsis thaliana proton transport ers, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999, Feb.) 第96巻	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) : 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	p. 1480-1485	
A	Lu, P. Y. et al. "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 第94巻 p. 8243-8248	1-14
A	Marrs, A. K. et al. "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995) 第375巻 第6530号 p. 397-400	1-14
T	Tanaka, S. et al. "Colour-enhancing protein in blue petals" Nature (2000, Oct.) 第407巻 p. 581	1-14

